



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**EFEITO DO FATOR NEUTRALIZANTE DE *Crotalus*(CNF), ISOLADO DO
PLASMA DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus*, SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE LEUCÓCITOS HUMANOS**

Caroline Vargas Xavier

PORTO VELHO/RO

2012

CAROLINE VARGAS XAVIER

**EFEITO DO FATOR NEUTRALIZANTE DE *Crotalus*(CNF), ISOLADO DO
PLASMA DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus*, SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE LEUCÓCITOS HUMANOS.**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biologia Experimental,
Núcleo de Saúde, da Universidade Federal
de Rondônia, como requisito para obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Dra Juliana Pavan Zuliani

PORTO VELHO/RO

2012

CAROLINE VARGAS XAVIER

**EFEITO DO FATOR NEUTRALIZANTE DE *Crotalus*(CNF), ISOLADO DO
PLASMA DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus*, SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE LEUCÓCITOS HUMANOS.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora

Dra Juliana Pavan Zuliani

Dr. Rodrigo Guerino Stábeli

Dra Rosely Valéria Rodrigues

Porto Velho, _____ de _____ de _____ .

Resultado _____

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço à minha mãe, Marilene, por tudo o que faz por mim... Por ser minha mãe!

Ao meu pai, João Carlos, por tudo o que representa e por sempre me incentivar a seguir em frente...

Aos meus irmãos, Camila e Ciro, cada um seguindo seu caminho, mas sempre presentes no coração.

Ao Diego, por compartilhar todos os momentos e pelo apoio incondicional.

Ao Anderson Makoto Kayano (Sr Kayano!), por me auxiliar desde o início da minha vida científica, pelos preciosos ensinamentos, pela amizade... Valeeeu Kayano!!

A Fabianne Lacouth da Silva, nem tenho palavras amiga... Foram muitas conversas, desabafos, risos, choros... Muitos momentos pra não esquecer...

À Sulamita da Silva Setúbal, pela assistência técnica, científica, psicológica, etc., etc... Thank's Sulinha!

Ao Onáassis, querido, obrigada por toda a ajuda durante esses tempos.

À Adriana Silva Pontes, por compartilhar momentos de angústia “pré- defesa”.

À Juliana Loca Furtado Fontes, pela disposição em ajudar.

Ao pessoal recém-chegado ao laboratório, Neriane, Ítalo, Jéssica, Letícia, Patrícia, João Rafael e Weverson, por “darem o sangue” pela pesquisa...

À Kayena Delaix Zaqueo pelo incentivo e companheirismo, obrigada!

À Frances Tatiane, pela amizade... Desde os idos tempos da faculdade...

À Elis Paula, pelos vários momentos de descontração.

À Aline, pela sempre colaboração mesmo que indiretamente.

Ao Dr Rodrigo Guerino Stábeli, pelo auxílio e suporte.

Ao Dr Andreimar Martins Soares, pela solicitude e valiosa contribuição na execução desse trabalho.

À Dra Consuelo Latorre Fortes-Dias, por ceder o CNF e pelo apoio.

À minha orientadora, Dra Juliana Pavan Zuliani, especialmente, pela paciência e confiança.

Ao Ipepatro/Fiocruz Rondônia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

**“A coisa mais bela que o homem pode
experimental é o mistério. É essa a emoção
fundamental que está na raiz de toda a ciência e
de toda a arte.”**

Albert Einstein

RESUMO

O fator neutralizante de *Crotalus* (CNF) é um inibidor de fosfolipase A₂ (FLA₂), isolado do plasma do sangue da cascavel Sul Americana, *Crotalus durissus terrificus*. Esse inibidor neutraliza tanto a atividade letal quanto enzimática (FLA₂) da crotoxina, a principal neurotoxina do veneno de *C. d. terrificus*. No presente estudo, foram investigados os efeitos do CNF sobre a funcionalidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e neutrófilos humanos. As células foram obtidas de doadores sadios através do método de gradiente de densidade. Foram avaliadas a viabilidade e proliferação, através da redução do MTT. A produção de citocinas foi mensurada realizando-se ensaio imunoenzimático. Adicionalmente, a liberação de mieloperoxidase (MPO) foi mensurada pelo consumo de peróxido, e a geração de ânion superóxido foi avaliada através da redução do NBT. O CNF não apresentou toxicidade sobre PBMCs e neutrófilos humanos. Em concentração não tóxica, o CNF, em PBMCs, atua estimulando a liberação de TNF- α , porém, não estimula a produção de IL-10 e IL-2 e não afeta a proliferação celular. Além disso, não induz liberação de ânion superóxido, mas inibe a produção de ânion superóxido quando estimulada pela crotoxina. Em neutrófilos, o CNF não induz a liberação tanto de MPO quanto de ânion superóxido, porém induz a produção de IL-8. Esses dados mostram a influência do CNF na função de PBMCs, por induzir a produção de TNF- α , e de neutrófilos, por estimular a produção de IL-8.

Palavras-chave: Inibidor FLA₂, CNF, Neutrófilos, PBMCs.

ABSTRACT

Crotalus neutralizing factor (CNF) is an inhibitor of phospholipase A₂ (PLA₂), isolated from blood plasma of the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. This inhibitor neutralizes the lethal and the enzymatic activity (PLA₂) of crotoxin, the main neurotoxin from the venom of *C. d. terrificus*. In this study, we investigated the CNF effects on the functionality of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and neutrophils. The cells were obtained from healthy donors by density gradient method. Viability and proliferation were evaluated through the reduction of MTT. Cytokine production was measured by immunoenzymatic assay. Additionally, the release of myeloperoxidase (MPO) was measured by the consumption of peroxide and superoxide anion generation was assessed by the reduction of NBT. The CNF had no toxicity on human PBMCs and neutrophils. In non-toxic concentration, the CNF, in PBMC, acts by stimulating the release of TNF- α , but do not stimulate IL-10 and IL-2 and does not affect cell proliferation. In addition, CNF does not induce superoxide anion release, but inhibits the production of superoxide anion when stimulated by crotoxin. In neutrophils, the CNF did not induce the release of both MPO and superoxide anion, however induces the production of IL-8. These data show the influence of the CNF on PBMCs function by inducing the production of TNF- α , and of neutrophils, by stimulating the production of IL-8.

Key-words: PLA₂ inhibitor, CNF, Neutrophils, PBMC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	12
Figura 2 - Efeito do CNF sobre a viabilidade de PBMCs humanos	26
Figura 3 - Efeito do CNF sobre a viabilidade por MTT em PBMCs humanos	27
Figura 4 - Efeito do CNF sobre a proliferação de PBMCs humanos	28
Figura 5 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-2 por PBMCs humanos.....	29
Figura 6 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-10 por PBMCs humanos.....	30
Figura 7 - Efeito do CNF sobre a produção de TNF- por PBMCs humanos	31
Figura 8 - Efeito do CNF sobre a produção de superóxido por PBMCs humanos	32
Figura 9 - Efeito do CNF sobre a viabilidade por MTT em neutrófilos humanos	33
Figura 10 - Efeito do CNF sobre a liberação de MPO por neutrófilos humanos	34
Figura 11 - Efeito do CNF sobre a produção de superóxido por neutrófilos humanos	35
Figura 12 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-8 por neutrófilos humanos	36

LISTA DE ABREVIATURAS

CNF – Fator Neutralizante de *Crotalus*

CA – Componente ácido da crotoxina

CB – Componente básico da crotoxina

CTX – Crotoxina

ConA – Concanavalina A

DMSO – Dimetil sulfóxido

E.P.M – Erro padrão da média

FLA₂ – Fosfolipase A₂

Ion - Ionomicina

INF – Interferon gama

TNF- – Fator de necrose tumoral alfa

IL-2 – Interleucina 2

IL-10 – Interleucina 10

IL-8 – Interleucina 8

KOH – Hidróxido de potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

MPO - Mieloperoxidase

NBT – *Nitroblue tetrazolium chloride* (Cloreto azul de nitrotetrazólio)

PBMCs – *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares do sangue periférico)

PBS – *Phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PMA – *phorbol miristato acetato* (acetato de forbol meristato)

MTT – 3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Brometo tiazolil azul tetrazólio)

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Inibidores de toxinas	14
1.2. Considerações gerais sobre leucócitos	16
2. Objetivos	21
2.1. Gerais	21
2.2. Específicos	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Toxinas	22
3.2. Comissão de Ética	22
3.3. Obtenção dos PBMCs	22
3.4. Obtenção dos Neutrófilos	22
3.5. Viabilidade por exclusão do azul de Tripan	23
3.6. Determinação da viabilidade celular por redução do MTT	23
3.7. Proliferação dos PBMCs	24
3.8. Determinação da produção do ânion superóxido por densidade óptica	24
3.9. Determinação da produção de citocinas por EIA	25
3.10. Dosagem da liberação do MPO por neutrófilos	25
3.11. Análise Estatística	26
4. Resultados	27
4.1. Efeito do fator neutralizante de <i>Crotalus</i> (CNF), isolado do plasma da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> , sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs)	27
4.2. Efeitos do CNF sobre a viabilidade por MTT em PBMCs	28
4.3. Efeitos do CNF sobre a proliferação de PBMCs	29
4.4. Efeitos do CNF sobre a produção de IL-2 a partir de PBMCs	30
4.5. Efeitos do CNF sobre a produção de IL-10 a partir de PBMCs	31
4.6. Efeitos do CNF sobre a produção de TNF- α a partir de PBMCs	32
4.7. Efeitos do CNF sobre a produção de superóxido a partir de PBMCs	33
4.8. Efeitos do CNF sobre a viabilidade por MTT em neutrófilos humanos	34
4.9. Efeitos do CNF sobre a liberação de mieloperoxidase (MPO) a partir de neutrófilos humanos	35

4.10. Efeitos do CNF sobre a produção de superóxido a partir de neutrófilos.....	36
4.11. Efeitos do CNF sobre a produção de IL-8 a partir de neutrófilos humanos.....	37
5. Discussão	38
6. Conclusões	43
7. Referências	44
8. Anexos.....	51
8.1. Soluções utilizadas	51
8.2. Drogas e reagentes.....	52
8.3. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	53

1 Introdução

Os acidentes ofídicos são considerados como uma doença ocupacional. recentemente, foi incorporada pela Organização Mundial de Saúde ao quadro das Doenças Tropicais Negligenciadas (GUTIERREZ, *et al.*, 2010; SOUZA, 2010). No Brasil a incidência de acidentes ofídicos notificados entre os anos de 2000 a 2007, foi de 192.703 casos (CARDOSO *et al.*, 2009).

Na América Latina a maioria dos acidentes ofídicos é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (cerca de 90%). Os acidentes causados pelo gênero *Crotalus* aparecem em segundo lugar, no entanto, é o gênero responsável pelo maior índice de letalidade. Esse gênero é responsável por cerca de 8% (SINAN, 2008) do total de acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (BRASIL, 2001), sendo que, no estado de São Paulo esta porcentagem aumenta para 25% (BARRAVIERA, 1990; CARDOSO *et al.*, 2009).

O gênero *Crotalus* compreende as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis (Figura 1), identificadas pela presença de um chocalho ou guizo na extremidade da cauda. Além disso, possuem uma estrutura robusta, são ágeis e apresentam hábitos terrestres (MELGAREJO, 2003).



Figura 1. Serpente *Crotalus durissus terrificus*. Popularmente conhecida como cascavel. Fonte: http://www.univap.br/cen/crotalus_serpentario.php

As serpentes desse gênero possuem ampla distribuição geográfica, habitando desde o cerrado do Brasil, as regiões semi-áridas do nordeste, até os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. Há cinco subespécies incluídas nesse grupo, sendo elas *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collineatus*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus marajoensis* e *Crotalus durissus terrificus*, esta última predominante nas regiões Sul e Sudeste (MELGAREJO, 2003).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, ainda, possui grande quantidade de polipeptídeos e proteínas que podem interferir em vários processos fisiológicos (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003). Sabe-se que ele não possui atividade inflamatória significativa e, no local da inoculação, desencadeia resposta inflamatória com discreto acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e edema de baixa intensidade (SOUSA-E-SILVA *et al.*, 1996). Além disso, quando ocorre dor, que não é frequente, ela surge com baixa intensidade. A parestesia local, também relatada após o envenenamento, parece ser o resultado de ações antinociceptiva e analgésica do veneno (PICOLO & CURY, 2004). Quanto aos efeitos sistêmicos, o veneno possui atividades miotóxica, coagulante e neurotóxica (NAHAS *et al.*, 1964; ROSENFELD, 1971; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1987; CUPO *et al.*, 1988). No geral, muitos componentes do veneno das serpentes participam do envenenamento. Dentre eles destacam-se as serinoproteases, responsáveis pela hemorragia; as metaloproteinases, que também produzem hemorragia e as fosfolipases A₂ (FLA₂), que agem na membrana celular e induzem a miotoxicidade (TAMAROZZI, *et al.*; 2006). As FLA₂ são dotadas de funções importantes em diversos processos biológicos, como a digestão de lipídios, homeostasia de membranas celulares, transdução de sinal e produção de mediadores lipídicos (VALENTIN & LAMBEAU, 2000).

Dentre as toxinas presentes no veneno de *Crotalus* destacam-se a convulsina, giroxina, crotamina, e a crotoxina, principal componente tóxico, representando 60% do veneno total (SLLOTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938; MOURA-GONÇALVES & VIEIRA, 1950; PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1981). A crotoxina é responsável pelos efeitos de miotoxicidade, juntamente com a crotamina, e de neurotoxicidade, levando à paralisação dos músculos esqueléticos, ptose palpebral, diminuição da motricidade ocular e da acuidade visual, além de insuficiência respiratória (ROSENFELD, 1971; AMARAL *et al.*; 1991).

A crotoxina é uma α -neurotoxina heterodimérica composta de duas subunidades, uma ácida – o componente A (CA) e uma básica – o componente básico (CB) com atividade de FLA₂ (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971). Cabe ressaltar que as fosfolipases dos

venenos de serpentes da família Viperidae estão classificadas no grupo II, que também engloba as enzimas presentes no fluido sinovial humano e em plaquetas (MURAKAMI *et al.*, 1995). Assim, a crotoxina pertence ao grupo II das FLA₂ secretórias.

No heterodímero natural, as subunidades CA e CB estão unidas por interações eletrostáticas não covalentes. O CA não apresenta atividade enzimática ou farmacológica, entretanto, atua como chaperonina e direciona o CB a seu alvo específico em membranas. Já, a subunidade CB age causando bloqueio de liberação de acetilcolina nas terminações nervosas das junções neuromusculares (BREITHAUPT, 1976; HABERMANN & BREITHAUPT, 1978; BON *et al.*, 1989).

Quanto aos efeitos biológicos, vários estudos têm mostrado que a crotoxina, CB e crotamina de *Crotalus durissus* apresentam atividades bactericida, anti-HIV, analgésica e anti-tumoral (SAMPAIO *et al.*, 2010; CURA *et al.*, 2002; VILLARRUBIA *et al.*, 2004; KERKIS *et al.*, 2010).

Com relação ao papel do veneno de *Crotalus* sobre a funcionalidade de leucócitos, SAMPAIO *et al.* (2003), demonstraram o efeito do veneno de cascavel sobre os macrófagos. Neste estudo foi observado que o veneno inibe o espriamento e fagocitose, mas aumenta o “burst” respiratório. Corroborando esses resultados, a literatura documenta que a crotoxina e o CB - a subunidade FLA₂ também inibem as funções de espriamento, mantendo a célula na forma arredondada, e de fagocitose por macrófagos de maneira similar ao veneno total, sendo assim considerada o fator responsável por esses efeitos (SAMPAIO *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2006^a).

1.1 Inibidores de toxinas

Os inibidores de toxinas presentes em serpentes foram primeiro identificados como sendo responsáveis pela proteção da serpente de um possível extravasamento de veneno das glândulas. Contudo, esses inibidores foram depois descritos também em serpentes não venenosas como na *Elaphe quadrivirgata* e na *Python reticulatus*, sugerindo outros papéis fisiológicos como, por exemplo, regulação da atividade local de FLA₂ (OKUMURA *et al.*, 1999 e 2002; THWIN *et al.*, 2000).

Vários inibidores de fosfolipases A₂ tóxicas, apresentando diversas origens moleculares como proteínas, extratos de plantas, componentes fenólicos, flavonóides e extrato metanólico, já foram isolados de mamíferos, serpentes venenosas, não venenosas, e plantas (LIZANO *et al.*, 2003; KAMMOUN *et al.*, 2011; SAMY *et al.*, 2011).

Os inibidores de FLA₂ isolados de mamíferos e serpentes venenosas são, em geral, glicoproteínas oligoméricas, tendo massa molecular variando entre 75 a 180 kDa. Esses inibidores, segundo a sequência de aminoácidos, classificam-se em três grupos: PLI₁, PLI₂, PLI₃ (OHKURA *et al.*, 1997).

Os inibidores do grupo PLI₁ possuem uma sequência com domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas tipo C cálcio-dependentes. Inibidores do tipo PLI₁ atuam preferencialmente em FLA₂ ácidas do grupo II do seu próprio veneno. O primeiro inibidor do tipo PLI₁ descrito foi isolado a partir da serpente *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. No entanto, mais tarde também foram identificados inibidores desse tipo nas serpentes *Trimeresurus flavoviridis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops asper*, e *Cerrophidion godmani* (OHKURA *et al.*, 1993; OKUMURA *et al.*, 1999; FAURE, 2000; FORTES-DIAS, 2002).

Os inibidores do grupo PLI₂ compreendem o grupo que possuem como principal característica a presença de nove repetições ricas em leucina (OHKURA *et al.*, 1997; OKUMURA *et al.*, 1998). A primeira proteína desse grupo foi descrita como uma glicoproteína globular ácida de 160 kDa, isolada do plasma de *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OHKURA *et al.*, 1997; OKUMURA *et al.*, 1998). Além disso, foi isolado também um inibidor da serpente não venenosa *Elaphe quadrivirgata* composto por duas subunidades com grande homologia entre si (OKUMURA *et al.*, 2002).

Os inibidores do grupo PLI₃ representam o maior dentre os três grupos. São caracterizados por possuírem uma estrutura altamente conservada de repetições de cisteínas em sequência, conhecida como motivos de três dedos (“three-finger motifs”) (OHKURA *et al.*, 1997). Tal característica estrutural é encontrada em proteínas com funções biológicas distintas, como as da superfamília Ly-6, do receptor ativador de plasminogênio tipo urokinase (u-PAR) e Robo-1 (FORTES-DIAS, 2002; LIZANO *et al.*, 2003). LIZANO *et al.*, 2003 propuseram uma subdivisão para esse grupo em PLI₃s da subclasse I e da PLI₃ da subclasse II, devido as diferenças entre seus membros. A classificação foi feita com base em análises bioquímicas, de sequência e no perfil de inibição de FLA₂, sendo que os inibidores da subclasse I são heteroméricos, com duas subunidades chamadas α e β e com identidade menor que 33% entre as mesmas, enquanto que, os da subclasse II, apresentam apenas uma subunidade.

Em 1991, FORTES-DIAS *et al.* purificaram uma proteína, a partir do plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus*, de massa molecular calculada em 23,6 kDa a partir de SDS-PAGE. Essa proteína foi denominada Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF). Três

etapas cromatográficas foram feitas, uma troca aniônica, uma troca catiônica e uma cromatografia de fase reversa; essas etapas foram acompanhadas por SDS-PAGE e ensaios de atividade fosfolipásica *in vitro* (FORTES-DIAS *et al.*, 1991) O CNF foi então classificado como um inibidor do tipo gama da classe II (OKHURA, *et al.*, 1997; LIZANO, *et al.*, 2003).

O CNF foi identificado como um peptídeo de cadeia única, composto de 181 resíduos de aminoácidos, pI de 5,45, contendo 16 resíduos de cisteína e um provável sítio de ligação de carboidrato no resíduo Asn¹⁵⁷ (FORTES-DIAS *et al.*, 1994). Na forma nativa, o CNF é compatível com um oligômero de 6 a 8 subunidades, já que exibe massa molecular de 160 ±10 kDa, a partir de cromatografia de filtração molecular e eletroforese em gel, sob condições não desnaturantes (FORTES-DIAS *et al.*, 1994).

O CNF é capaz de neutralizar tanto a atividade letal quanto a enzimática (FLA₂) do veneno bruto de *C. durissus terrificus* e da crotoxina (FORTES-DIAS *et al.*, 1990; 1991; 1994). O mecanismo envolvido na inibição da ação tóxica da crotoxina pelo CNF se dá pelo deslocamento e substituição do componente ácido (CA) no complexo crotoxina (CA/CB) por CNF. Forma-se, então, um complexo composto por CNF e CB (CNF/CB) que não possui toxicidade. Dessa forma, o CNF funciona como um receptor solúvel para CB (FORTES-DIAS *et al.*, 1994; PERALES *et al.*, 1995). Além disso, o CNF é capaz não só de competir com o receptor de membrana pela ligação a CB, como também consegue deslocar, parcialmente, a toxina já ligada ao receptor em modelos de sinaptossomas (dos SANTOS *et al.*, 2005).

Embora os efeitos sistêmicos do veneno de *Crotalus* sejam neutralizados através da aplicação do soro anticrotálico, devido à sua natureza heteróloga, por vezes o soro antiofídico pode desencadear reações indesejadas, chegando a intensos efeitos colaterais (CHIPPAUX & GOYFFON, 1998), de forma que inibidores de toxinas como o CNF, podem se tornar possíveis ferramentas na resolução do envenenamento, pois o CNF além de inibir a FLA₂, consegue até mesmo deslocar parcialmente a toxina já ligada ao receptor na membrana (dos SANTOS *et al.*, 2005). Mesmo o CNF apresentando características importantes que o coloca como protótipo biotecnológico, pelos efeitos fisiológicos apresentados, ainda não é conhecida a ação desse inibidor frente à ativação celular, objetivo deste trabalho.

Ainda no âmbito dos inibidores de toxinas, OLIVEIRA *et al.*, 2011, demonstraram que proteínas inibitórias isoladas do plasma da serpente *Bothrops jararacussu* (BjussuMIPs) apresentaram propriedades inibitórias sobre diferentes FLA₂ isoladas dos venenos de serpentes *Bothrops* e *Crotalus*. Além disso, os BjussuMIPs do tipo e , revelaram propriedades

farmacológicas como a inibição da atividade de FLA₂, anticoagulante, miotóxica, indução de edema, citotóxica, bactericida e letal.

Em relação ao espectro de inibição, FORTES-DIAS *et al.*, 1999 demonstraram que o CNF consegue inibir tanto a crotoxina, quanto uma fosfolipase A₂ básica e três ácidas purificadas a partir do veneno de *Lachesis muta muta* (FORTES-DIAS, *et al.*, 1999). Além de inibir FLA₂ do veneno autólogo e de venenos de outras espécies, sabe-se que o CNF não atua sobre a FLA₂ humana, corroborando, dessa forma, uma potencial utilização do CNF como ferramenta capaz de neutralizar, pelo menos em parte, além do envenenamento crotálico, envenenamentos ocasionados também por outras serpentes. Dessa forma, estudos para investigar de modo mais detalhado o papel do CNF sobre a funcionalidade celular, bem como seu potencial na prospecção biotecnológica, tornam-se relevantes, uma vez que ainda são escassos.

1.2 Considerações gerais sobre leucócitos

A inflamação é uma resposta do organismo a agressões de naturezas diversas, que podem ser físicas, químicas e biológicas. Ela se caracteriza por sinais clássicos descritos por Cornelius Celsus por rubor, tumor, calor e dor. Esses sinais se devem a ação dos mediadores químicos que são liberados no local da lesão. A reação inflamatória envolve uma diversidade de eventos vasculares e celulares característicos que envolvem vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, levando ao aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática e conseqüente migração leucocitária, cuja finalidade é a eliminação dos agentes injuriosos pelos fagócitos (RYAN & MAJNO, 1977; LENTSCH & WARD, 2000; KULINSKY, 2007).

As primeiras células a migrarem para o foco da lesão são os neutrófilos e, em seguida, os monócitos (SHERWOOD *et al.*, 2004). Uma vez nos tecidos, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, são ativados e desenvolvem suas funções. Durante o desempenho de suas funções essas células liberam enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes e microbicidas, além de diversos mediadores inflamatórios, como citocinas e mediadores lipídicos (MACMICKING *et al.*, 1997; POLIOUT *et al.*, 1998; YU *et al.*, 1998).

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares considerados a primeira linha de defesa do organismo e auxiliam no combate às infecções, fagocitando e matando o agente invasor. Após serem estimulados, sofrem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais (FUCHS *et al.*, 2007), ocorrendo aumento da capacidade de produção e secreção de

mediadores inflamatórios, bem como de agentes microbicidas e tumorícas (CALDER *et al.*, 1995).

Para destruição dos agentes fagocitados, os neutrófilos utilizam as vias oxidativa, com geração de espécies reativas do oxigênio e, a não oxidativa, com ação das enzimas lisossomais. Sendo a mieloperoxidase (MPO) a enzima chave na via oxidativa (CASSATELA, 1995).

A geração de agentes microbicidas, como as espécies reativas do oxigênio, se inicia pela ativação da enzima NADPH oxidase, a qual é formada por cinco componentes (p67, p40, p47, GTPase e Rac2) distribuídos entre a membrana do fagossoma e o citoplasma celular. A ativação da NADPH oxidase catalisa a produção de ânion superóxido, que em seguida é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase. Grande parte do peróxido formado leva a formação de um complexo a partir da reação com a mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Por sua vez, o complexo formado reage com íons cloro e forma o ácido hipocloroso (De LEO & QUINN, 1996; BABIOR *et al.*, 2002) principal espécie reativa do oxigênio produzida por neutrófilos (KLEBANOFF, 2005), entretanto, além da função microbicida, é possível que haja também uma participação maior da MPO na bioquímica de neutrófilos e monócitos, como na imunomodulação (SCHRECK & ALBERMANN, *et al.*, 1992).

A resposta imune ao agente invasor, antígenos não próprios, resulta em rápida expansão de linfócitos efetores com especificidade para o antígeno indutor. Os linfócitos podem ser divididos em duas subpopulações principais que apresentam grande heterogeneidade de funções e especificidade antigênica: os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos e os linfócitos T que auxiliam as células B e outras células através de interações celulares diretas e da secreção de citocinas. (CLAMAN, 1987).

Os linfócitos T são produtores de citocinas, dentre as quais a IL-2 funciona como fator de crescimento e diferenciação para estas células. Simultaneamente, com a secreção de IL-2, ocorre aumento da expressão de receptores de membrana para esse fator de crescimento, o que possibilita a proliferação celular. Outras citocinas também são produzidas por linfócitos T, como IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. De acordo com o padrão de citocinas que os linfócitos T produzem quando ativados é que ocorre a distinção fenotípica entre essas células em subpopulações TH1 e TH2 (KIDD, 2003).

Linfócitos TH1 produzem citocinas associadas à ativação de macrófagos, bem como de outros fagócitos, onde se destaca o principalmente IFN- γ , que aumenta a expressão de

moléculas do MHC de classe II e a produção de espécies reativas do oxigênio em macrófagos (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005). As ações do IFN- γ são reguladas, positivamente, por IL-12 e IL-18 (OKAMURA, 1998) e, negativamente, por IL-10 e IL-4 (SCHINDLER & LUTZ, 2001). Já, os linfócitos com padrão TH2 produzem citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, sendo que IL-10 e IL-4 possuem efeitos inibidores sobre a produção de citocinas em células TH1.

A IL-10 é uma citocina produzida por células do sistema imunológico tais como monócitos, macrófagos e subpopulações particulares de células T, incluindo Tr1, Treg e células TH1. Sua ação se dá através de um complexo receptor transmembrana, composto de IL-10R1 e IL-10R2, regulando as funções de muitas e diferentes células do sistema imunológico (SABAT *et al.*, 2010). Adicionalmente, atua como um potente modulador das funções monocíticas e macrofágicas, uma vez que inibe a capacidade destas células de apresentar antígenos (FRUCHT & FUKAO, 2001). Ainda, esta citocina inibe a produção de TNF- α e IL-1 e liberação de radicais livres do oxigênio (FRUCHT & FUKAO, 2001).

O TNF- α apresenta-se como citocina pleiotrópica produzida por diferentes tipos celulares, dentre eles, as células da linhagem monocítica, como macrófagos, células de Kupffer e macrófagos alveolares, além de ser liberada também por linfócitos T e B ativados, dentre outros tipos celulares (PFEFFER, *et al.*, 1993; FLYNN, *et al.*, 1995). Adicionalmente, o TNF- α aumenta a expressão de receptores para IL-2 e a resposta proliferativa a antígenos. Em linfócitos B, induz sua diferenciação em plasmócitos, com conseqüente produção de imunoglobulinas (VASSALI, 1992). O TNF- α atua através de dois receptores de membrana, o receptor 1 de TNF (TNFR1) e o receptor 2 de TNF (TNFR2). Ambos contêm quatro repetições ricas em cisteína no domínio extracelular. O TNFR1 é constitutivamente expresso em diversos tecidos de mamíferos enquanto que o TNFR2 é altamente regulado e tipicamente expresso nas células do sistema imune. (BANNER, *et al.*, 1993; TARTAGLIA, *et al.*, 1993).

Cabe ressaltar que o TNF- α mostra-se como um excelente mediador da resposta inflamatória, já que é capaz de produzir uma gama de efeitos e consegue ativar ou suprimir vários genes responsáveis pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias, de outros mediadores e de proteínas de fase aguda (PORTEU & NATHAN, 1990).

Uma vez que os leucócitos desempenham papel primordial na resolução da inflamação, estando diretamente envolvidos nos processo de envenenamentos, e tomando o CNF como possível modelo para que sejam desenvolvidos antídotos para os envenenamentos,

o conhecimento sobre a função e estado de ativação dessas células na vigência do CNF torna-se importante.

2 Objetivos

2.1 Gerais

Avaliar o efeito do fator neutralizante de *Crotalus* (CNF), isolado do plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus*, sobre a funcionalidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e neutrófilos humanos.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito do CNF sobre os seguintes parâmetros em PBMCs.

- Viabilidade celular
- Proliferação celular
- Produção de citocinas (IL-2, IL-10, TNF-)
- Geração de ânion Superóxido

Avaliar o efeito do CNF sobre os seguintes parâmetros em neutrófilos.

- Viabilidade celular
- Liberação de mieloperoxidase
- Produção de citocinas (IL-8)
- Geração de ânion superóxido

3 Material e métodos

3.1 Toxina

O CNF foi fornecido pela Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte - Minas Gerais. Até o momento da sua utilização, a toxina seca, foi mantida e condicionada a 4°C. As autorizações para atividades com finalidade científica são: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Números: 11094-2, 11094-1, 10394-1 e 15484-1.

3.2 Comissão de ética

O presente estudo foi submetido à análise da comissão de ética em pesquisa do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical – CEPEM e aprovado sob número 108/2010.

3.3 Obtenção dos PBMCs

A obtenção dos PBMCs foi feita através do método de gradiente de densidade por Hystopaque 1077[®]. Para o isolamento dos PBMCs foram coletados 20 mL de sangue por punção venosa de voluntários sadios que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Após a coleta, feita em tubos heparinizados, o sangue foi diluído em tampão fosfato-salina (PBS) na proporção de 1:1. Em tubos cônicos de 15 ml foram adicionados 7 mL de Hystopaque 1077[®] e 7 mL do sangue diluído. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400g por 30 minutos. A nuvem de PBMCs formada na interface do plasma sanguíneo com o Hystopaque foi coletada e transferida para outro tubo. A essas células foram adicionados 10 mL de PBS para lavagem. Em seguida, foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500g e, após, o sobrenadante foi descartado. O processo de lavagem foi repetido três vezes. Feita a última centrifugação, o PBS foi descartado e adicionou-se 1 mL de meio RPMI suplementado com estreptomicina (100µg/mL), penicilina (100µg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota de 5 µL do volume foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e, após a contagem, o volume foi ajustado para a utilização de 2×10^5 células.

3.4 Obtenção dos neutrófilos

Para isolamento dos neutrófilos, o sangue foi coletado e diluído como descrito no item 3.3. Após a coleta da nuvem de PBMCs, o precipitado de hemácias e neutrófilos foi retirado e

separado em outro tubo. Para o isolamento dos neutrófilos, foi adicionado tampão de lise de hemácias ao precipitado separado, na proporção de 1:2 e, em seguida, o tubo foi refrigerado a -20°C por 5 minutos. Transcorrido o tempo determinado, o tubo foi centrifugado a 400g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Esse processo foi repetido por três vezes. Os neutrófilos foram então lavados com PBS, adicionou-se 1 mL de Meio RPMI suplementado. Uma alíquota de 5 μL do volume foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e, após a contagem, o volume foi ajustado para a utilização de 2×10^5 células.

3.5 Viabilidade por exclusão do azul de Tripán

Para o ensaio de viabilidade por azul de Tripán, desenvolvido como descrito por ZULIANI *et al.*, 2005, foram adicionados 2×10^5 PBMCs suspensos em meio RPMI suplementado e as células foram incubadas por 15 horas a 37°C e 5% de CO_2 em RPMI para controle e, nas concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ de CNF para o grupo experimental, num volume final de 100 μL . Após, o tempo determinado, foram adicionados 20 μL de solução de azul de Tripán a 0,1%. O índice de viabilidade foi determinado pela contagem de células vivas ou não, em câmara de Neubauer, ao microscópio de luz, num total de 100 células. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células.

3.6 Determinação da viabilidade celular por redução do MTT

A viabilidade foi determinada através do método de redução do MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Assim, os PBMCs (2×10^5) foram cultivados em placas de 96 poços com 250 μL de RPMI suplementado e incubados com CNF na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (grupo experimental), LPS (grupo controle positivo) ou RPMI (grupo controle negativo), por 24 horas, a 37°C , em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 400g e o sobrenadante retirado. Em seguida, 10 μL de MTT (5mg/mL em PBS) e 90 μL de RPMI/poço foram adicionados, seguidos de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , por 3 horas. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante desprezado, e então adicionados 200 μL de PBS para remoção do MTT não internalizado. Em seguida, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e, posteriormente adicionados 100 μL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Decorridos 1 hora e 30 minutos para a solubilização, o grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medida de

densidade óptica a 570nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em absorbância (D.O.).

3.7 Proliferação de PBMCs

A proliferação dos PBMCs foi avaliada através do método colorimétrico de MTT segundo descrito por MOSMANN, 1983. Resumidamente, 2×10^5 células foram incubadas, para um volume final de 250 μ l, com CNF (50 μ g/mL), RPMI (controle) ou Concanavalina A (5 μ g/mL - controle positivo), durante 96 horas em atmosfera úmida de 5% de CO₂, a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 10 μ l de MTT (5mg/mL em PBS) e as células incubadas por 4 horas. Decorrido o tempo, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 400g, o sobrenadante foi descartado e adicionados 200 μ L de PBS para remover o MTT não internalizado. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e o PBS descartado. Adicionou-se, 100 μ l de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Decorridos 1 hora e 30 minutos para a solubilização, o grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medida de densidade óptica a 570nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em absorbância (D.O.).

3.8 Determinação da produção do ânion superóxido por densidade óptica

A geração de superóxido foi estimada através da redução do “nitroblue tetrazolium” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Para este ensaio, após o isolamento dos PBMCs e neutrófilos, foram incubadas 2×10^5 células na presença de 0,1% de NBT, com meio de cultura RPMI (controle), PMA na concentração de 500 ng/mL (controle positivo) ou CNF na concentração de 50 μ g/mL, a 37°C e atmosfera úmida de 5% de CO₂. Para o teste de duas horas com PBMCs, ainda foram incubados crotoxina (6 μ g/mL) e CNF (50 μ g/mL) acrescido de crotoxina (6 μ g/mL). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Em seguida, o PBS foi retirado e foram adicionados 100 μ l de KOH/DMSO para solubilização do NBT. Após 1 hora de solubilização, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados foram expressos em absorbância (D.O.).

3.9 Determinação da produção de citocinas por EIA

Para a dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (EIA), os PBMCs ou neutrófilos (2×10^5 células), obtidos como descrito anteriormente, foram incubados com o CNF (50 µg/mL) e RPMI (controle). Como controles positivos foram utilizados LPS (1 µg/mL) ou PMA (150 µg/mL) acrescido de Ionomicina (1 µg/mL). A seguir, as células foram incubadas durante 15 horas a 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Placas de 96 poços (NUNC MaxiSorp) foram sensibilizadas com anticorpo de captura (anti IL-2, IL-10, TNF- α , IL-8) dissolvidos em tampão fosfato 0,1M, durante 12 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS contendo 0,5% de Tween 20) por 3 vezes em lavadora de placas. Os sítios livres foram bloqueados com 100 µL de tampão de bloqueio, contendo 1% de BSA em PBS e, as placas, incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas por três vezes com PBS-Tween e adicionados 100 µL de sobrenadante de cultura de PBMCs ou de neutrófilos ou de padrões de citocina recombinante e, incubadas durante 2 horas, em temperatura ambiente. Decorridas esse período, as placas foram lavadas com PBS-Tween e 100 µL de solução de anticorpos biotinilados anti-citocinas foram adicionados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens, a presença de anticorpos biotinilados foi detectada com a incubação, durante 20 minutos, de 100 µL de streptavidina-peroxidase (1:200). As placas foram novamente lavadas e adicionados 100 µL de reagente cromogênico TMB (0,1mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato-citrato 0,05M (pH 5,0), contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com a citocina recombinante correspondente para a determinação da concentração desta citocina representada em pg/mL.

3.10 Dosagem da liberação de MPO por neutrófilos

Para dosagem da liberação de MPO, os neutrófilos foram isolados como descrito no item 3.4. As células foram incubadas com CNF (50 µg/mL), RPMI (controle) ou LPS (1 µg/mL - controle positivo), em placas de cultura, por 24 horas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ e 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para a dosagem de MPO. Em poços de placas de cultura foram adicionados 90 µL da solução preparada com os reagentes peróxido (A) e cromógeno (B) na proporção 1:1. Em

seguida adicionou-se 10 µl de amostra e incubou-se por 5 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ a 2N. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em absorbância (D.O.).

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni ou realizadas pelo Teste “t” Student, no programa Graph Pad Prism 5.0. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 Resultados

4.1 Efeito do fator neutralizante de *Crotalus* (CNF), isolado do plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs).

A viabilidade celular, realizada pelo método da exclusão do azul de Tripán, mostrou que o CNF, nas concentrações de 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, no período de 15 horas, não alterou significativamente esse parâmetro se comparado ao controle. A taxa de viabilidade dos PBMCs controle foi de 99%. Não houve diferença entre as diferentes concentrações de CNF utilizadas (Figura 2).

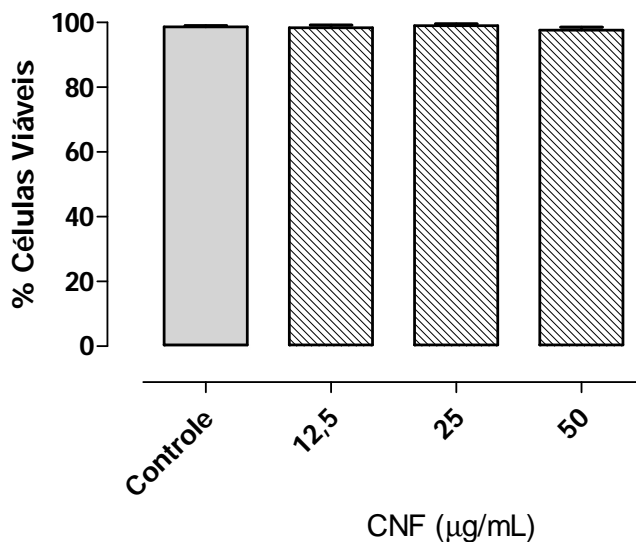


Figura 2 - Efeito do CNF sobre a viabilidade de PBMCs humanos. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com diferentes concentrações de CNF, descritas acima, ou RPMI (controle) por um período de 15 horas. A viabilidade dos PBMCs foi avaliada pelo método de Tripán. Os dados representam a média + EPM de 4 doadores.

4.2 Efeitos do CNF sobre a viabilidade por MTT em PBMCs.

A viabilidade celular, realizada através do método de redução do MTT, mostrou que o CNF, na concentração de 50 µg/mL e no período de 24 horas de incubação, não alterou a viabilidade dos PBMCs se comparado aos controles negativo (PBMCs incubados com meio de cultura RPMI) e positivo (PBMCs incubados com LPS - 1 µg/mL) (Figura 3).

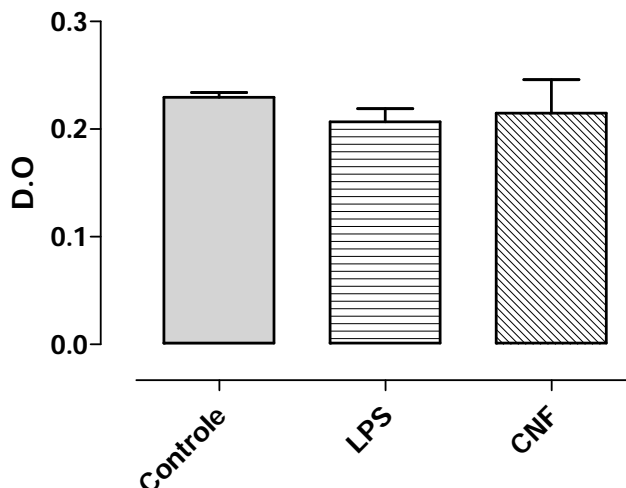


Figura 3 - Efeito do CNF sobre a viabilidade por MTT em PBMCs humanos. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com o CNF (50 µg/mL) ou RPMI (controle negativo) ou LPS (controle positivo - 1µg/mL) por um período de 24 horas. A viabilidade dos PBMCs foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os dados representam a média ± EPM de 4 doadores.

4.3 Efeitos do CNF sobre a proliferação de PBMCs.

A capacidade proliferativa dos PBMCs foi avaliada após a incubação das células com RPMI (controle) ou concanavalina A (5 µg/mL - controle positivo) ou CNF (50 µg/mL). A figura 4 mostra que o CNF não estimulou a proliferação dos PBMCs se comparado aos controles.

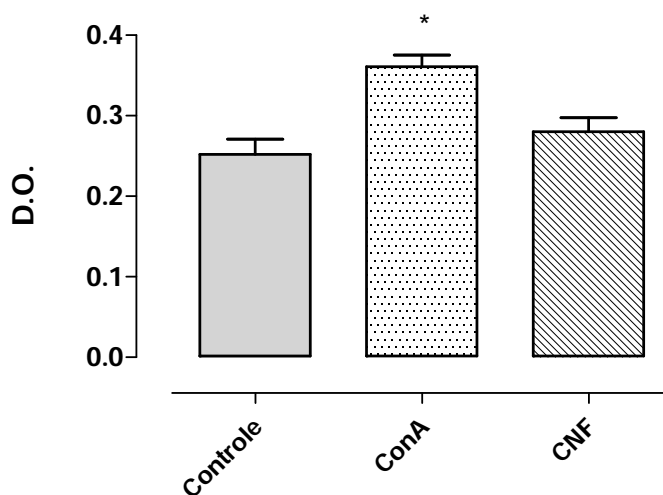


Figura 4 - Efeito do CNF sobre a proliferação de PBMCs humanos. Os PBMCs (2×10^5) foram incubados, por 96 horas, com RPMI (controle negativo) ou concanavalina A (5 µg/mL - controle positivo) ou CNF (50 µg/mL), a 37°C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram solubilizados e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 620nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos em D.O. e representam a média ± EPM de 3-4 doadores. *p 0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.4 Efeitos do CNF sobre a produção de IL-2 a partir de PBMCs

Para avaliar se o CNF era capaz de estimular a produção de IL-2, os PBMCs foram incubadas com RPMI (controle negativo), PMA adicionado de ionomicina (controle positivo) e CNF, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A figura 5 mostra que o CNF não induziu produção de IL-2 pelos PBMCs quando comparado aos controles. Os PBMCs incubados com PMA adicionado de ionomicina (controle positivo) produziram, significativamente, IL-2 ($2199 \pm 47,98 \text{ pg/mL}$) se comparados ao controle incubado apenas com RPMI, controle negativo, ($40,93 \pm 1,81 \text{ pg/mL}$).

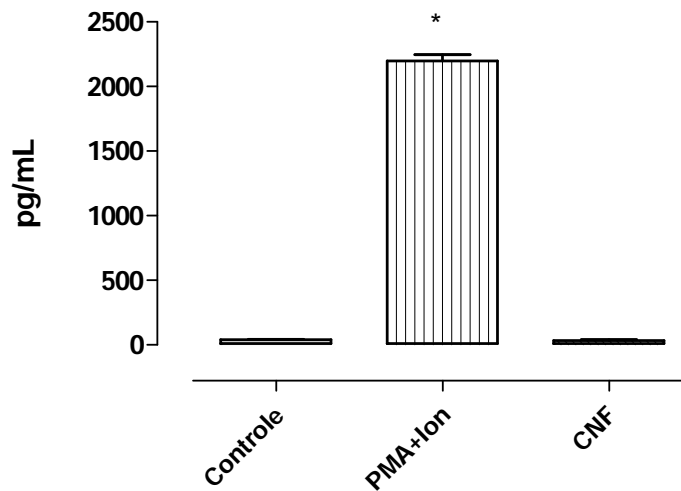


Figura 5 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-2 por PBMCs humanos. Os PBMCs (2×10^5) foram incubados com a concentração não citotóxica do CNF (50 $\mu\text{g/mL}$), por 15 horas ou RPMI (controle negativo) ou PMA (150 $\mu\text{g/mL}$) + Ionomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), como controle positivo. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das concentrações de IL-2 por EIA. Os dados representam a média \pm EPM de 4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.5 Efeitos do CNF sobre a produção de IL-10 a partir de PBMCs.

Para verificar a capacidade do CNF em induzir a produção de IL-10, os PBMCs foram incubados durante 15 horas com RPMI (controle), CNF (50 µg/mL) ou LPS (1 µg/mL – controle positivo). A figura 6 mostra que o CNF na concentração utilizada não afetou a produção dessa citocina quando comparado ao controle, entretanto, o controle positivo com LPS produziu significativamente IL-10 ($181,1 \pm 16,63$ pg/mL) em relação ao controle apenas com RPMI ($76,22 \pm 12,77$ pg/mL).

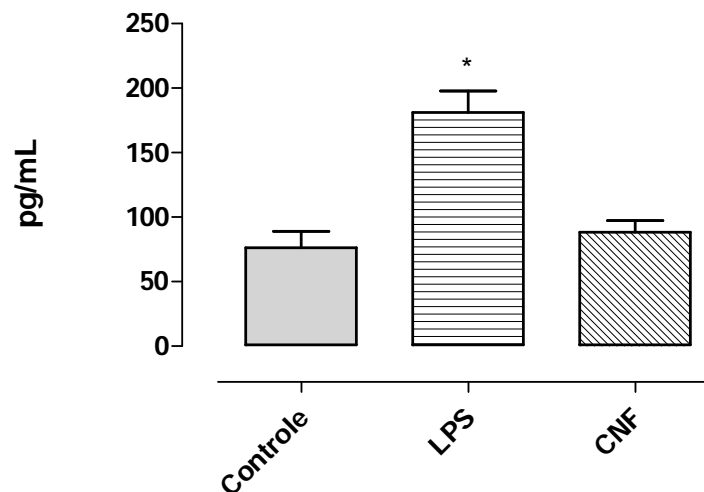


Figura 6 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-10 por PBMCs humanos. Os PBMCs (2×10^5 células) foram incubados com a concentração não citotóxica do CNF (50 µg/mL), durante 15 horas ou RPMI (controle negativo) ou LPS (controle positivo). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das concentrações de IL-10 por EIA. Os dados representam a média \pm EPM de 4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.6 Efeitos do CNF sobre a produção de TNF- α a partir de PBMCs

Para verificar a capacidade do CNF em induzir a produção de TNF- α , os PBMCs foram incubados durante 15 horas com RPMI (controle), LPS (controle positivo) ou CNF, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A figura 7 mostra que o CNF mostrou-se capaz de induzir significativamente a produção de TNF- α , que foi de $(509,2 \pm 47,93 \text{ pg/mL})$, em relação ao controle, que produziu $(157,3 \pm 10,07 \text{ pg/mL})$. Já o controle positivo com LPS teve produção $(503,1 \pm 98,08 \text{ pg/mL})$.

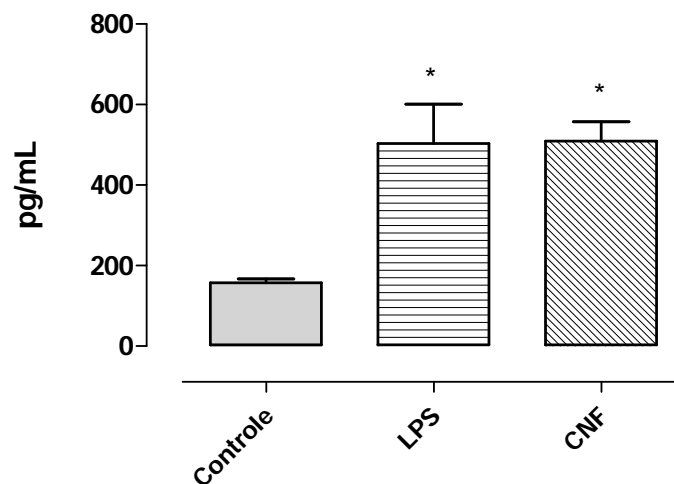


Figura 7 - Efeito do CNF sobre a produção de TNF- α por PBMCs humanos. Os PBMCs (2×10^5 células) foram incubados com a concentração não citotóxica do CNF (50 $\mu\text{g/mL}$), por 15 horas ou RPMI (controle negativo) ou LPS (controle positivo). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das concentrações de TNF- α por EIA. Os dados representam a média \pm EPM de 4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.7 Efeitos do CNF sobre a produção de superóxido a partir de PBMCs.

Com o intuito de investigar a interferência do CNF no “burst” respiratório, avaliou-se a produção de ânion superóxido por PBMCs. Assim, as células foram incubadas por 2 horas com RPMI (controle negativo), PMA (controle positivo), CNF (50 µg/mL), crotoxina (6 µg/mL) ou CNF, na concentração de 50 µg/mL acrescido de 6 µg/mL de crotoxina. A crotoxina foi utilizada para verificar a capacidade de inibição do CNF sobre a crotoxina na produção de superóxido.

A figura 8 mostra que o CNF não induziu aumento, em relação ao controle, da produção de superóxido. Por outro lado, a crotoxina estimulou significativamente, em relação ao controle, a produção de superóxido. Quando a crotoxina foi incubada juntamente com o CNF houve uma redução significativa da produção de ânion superóxido, induzida pela crotoxina.

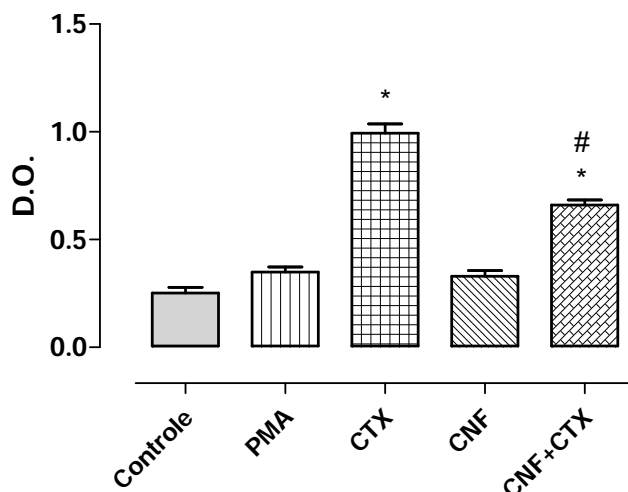


Figura 8 - Efeito do CNF sobre a produção de superóxido por PBMCs humanos. Os PBMCs (2×10^5) foram incubados com solução de 0,1% de NBT contendo RPMI (controle negativo) ou PMA (500 ng/mL - controle positivo) ou CNF (50 µg/mL) ou crotoxina (6 µg/mL) ou CNF (50 µg/mL) acrescido de crotoxina (6 µg/mL), por um período de 2 horas, a 37°C e 5% de CO₂ para a formação dos cristais formazan, resultantes da redução do NBT pelo superóxido. Os cristais foram solubilizados e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 620nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos em D.O. e representam a média ± EPM de 3-4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle. e # $p < 0,05$ em relação á crotoxina (ANOVA).

4.8 Efeitos do CNF sobre a viabilidade por MTT em neutrófilos humanos.

A viabilidade celular, realizada através do método de redução do MTT, mostrou que o CNF, na concentração de 50 µg/mL e no período de 15 horas de incubação, não alterou a viabilidade dos neutrófilos se comparado ao controle negativo (neutrófilos incubados com meio de cultura RPMI) (Figura 9).

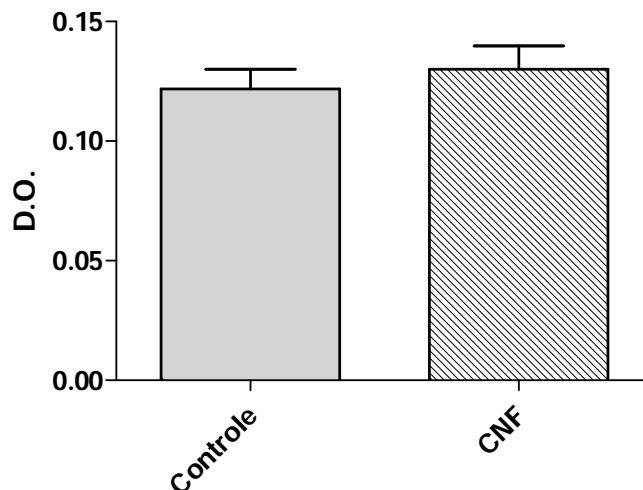


Figura 9 - Efeito do CNF sobre a viabilidade por MTT em neutrófilos humanos. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os neutrófilos isolados foram incubados com o CNF (50 µg/mL) ou RPMI (controle negativo) por um período de 24 horas. A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os dados representam a média ± EPM de 4 doadores. *p 0,05 em relação ao controle. Teste “t” Student.

4.9 Efeitos do CNF sobre a liberação de mieloperoxidase (MPO) a partir de neutrófilos humanos.

Para avaliar a capacidade do CNF em estimular os neutrófilos a liberar MPO, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo) e CNF, na concentração de 50 µg/mL, por um período de 24 horas. A figura 10 mostra que o CNF não induziu a liberação de MPO pelos neutrófilos se comparado aos controles. Os neutrófilos incubados com LPS (controle positivo) liberaram, significativamente, MPO ($0,243 \pm 0,012$ pg/mL) se comparados ao controle incubado apenas com RPMI (controle negativo).

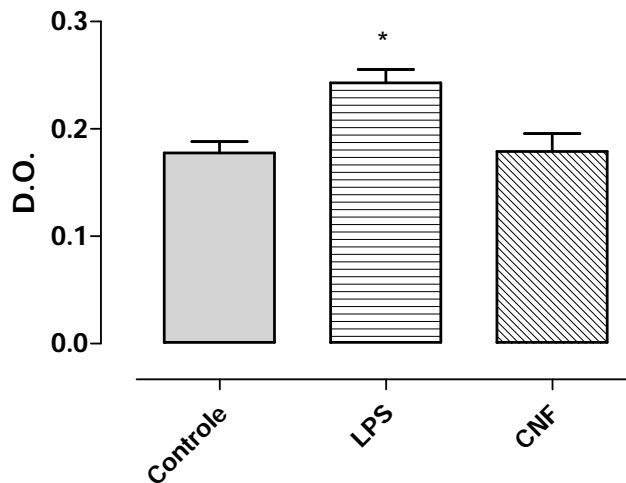


Figura 10 - Efeito do CNF sobre a liberação de MPO por neutrófilos humanos. Os neutrófilos (2×10^5) foram incubados com a concentração não citotóxica do CNF (50 µg/mL), por 24 horas ou RPMI (controle negativo) ou LPS (1 µg/mL) (controle positivo). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das concentrações de MPO por espectrofotômetro. Os dados representam a média \pm EPM de 4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.10 Efeitos do CNF sobre a produção de superóxido a partir de neutrófilos.

Com o intuito de se investigar se o CNF interferia no “burst” respiratório, avaliou-se a produção de ânion superóxido por neutrófilos. Assim, as células foram incubadas por 1 hora com RPMI (controle negativo), PMA (controle positivo), CNF (50 µg/mL). A figura 11 mostra que o CNF não induziu aumento, em relação ao controle, da produção de superóxido. Por outro lado, os neutrófilos incubados com PMA (controle positivo) produziram, significativamente, superóxido ($0,3203 \pm 0,04$ pg/mL) se comparados ao controle incubado apenas com RPMI (controle negativo).

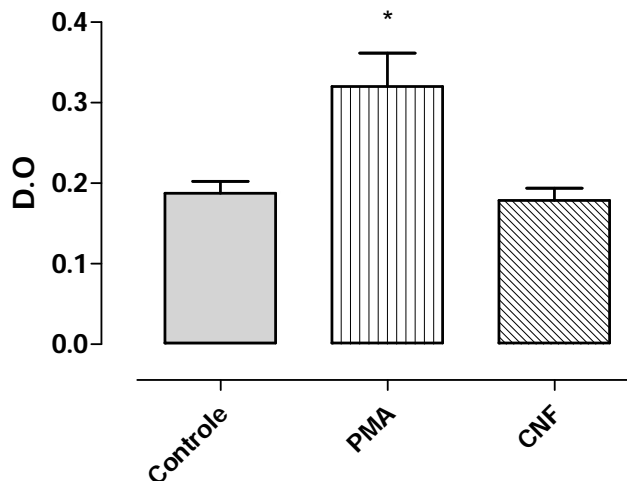


Figura 11 - Efeito do CNF sobre a produção de superóxido por neutrófilos humanos. Os neutrófilos (2×10^5) foram incubados com solução de 0,1% de NBT contendo RPMI (controle negativo) ou PMA (500 ng/mL - controle positivo) ou CNF (50 µg/mL), por um período de 1 hora, a 37°C e 5% de CO₂ para a formação dos cristais formazan, resultantes da redução do NBT pelo superóxido. Os cristais foram solubilizados e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 620nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos em D.O. e representam a média ± EPM de 4 doadores. *p 0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.11 Efeitos do CNF sobre a produção de IL-8 a partir de neutrófilos humanos.

Para avaliar a influência do CNF na capacidade de estimular os neutrófilos a produzir IL-8, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo) e CNF, na concentração de 50 µg/mL, por um período de 15 horas. A figura 12 mostra que o CNF induziu, significativamente, a produção de IL-8 pelos neutrófilos ($387,2 \pm 24,37$ pg/mL) se comparado ao controle com RPMI ($45,24 \pm 0,36$ pg/mL). Os neutrófilos incubados com LPS (controle positivo) também produziram, significativamente, IL-8 se comparados ao controle incubado apenas com RPMI (controle negativo).

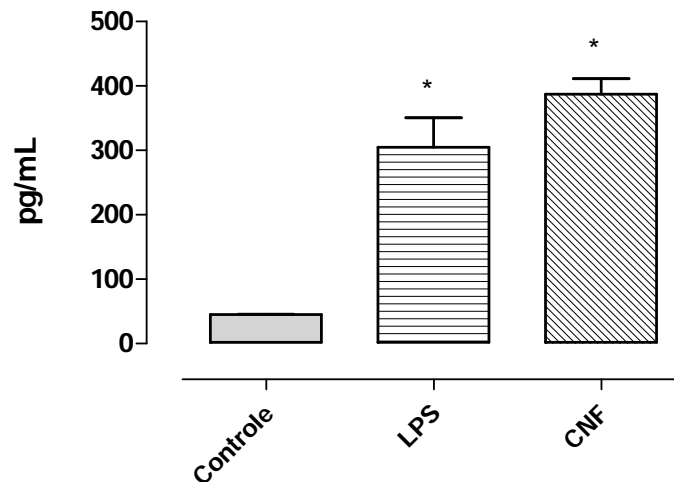


Figura 12 - Efeito do CNF sobre a produção de IL-8 por neutrófilos humanos. Os neutrófilos (2×10^5) foram incubados com a concentração não citotóxica do CNF (50 µg/mL), por 15 horas ou RPMI (controle negativo) ou LPS (1 µg/mL) (controle positivo). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das concentrações de IL-8 por EIA. Os dados representam a média \pm EPM de 4 doadores. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

5 Discussão

O CNF é candidato para protótipo a ser estruturado biotecnologicamente para alternativa no tratamento do envenenamento preferencialmente crotálico, podendo ser estendido para outros envenenamentos da mesma ordem. No entanto, os efeitos do CNF em células humanas não são conhecidos. Desse modo, no presente estudo, investigou-se a toxicidade do CNF sobre células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMCs). Os resultados iniciais obtidos não mostraram toxicidade do CNF *in vitro* tanto no ensaio de azul de tripan quanto no de MTT. As concentrações de 12,5µg/mL, 25µg/mL e 50µg/mL foram utilizadas e incubadas com os PBMCs. Como nenhuma das concentrações acima afetou a viabilidade celular dos PBMCs humanos, a concentração de 50 µg/mL foi utilizada para os experimentos a seguir. Dados semelhantes foram obtidos por OLIVEIRA *et al.*, 2011 que mostraram que o BjussuMIP, um inibidor de FLA₂ isolada do plasma de *Bothrops jararacussu*, não é tóxico para células endoteliais de camundongos (tEnd). O fato do CNF não afetar a viabilidade celular humana, possibilita seu uso para novas proposições de intervenção no tratamento do envenenamento. Cabe ressaltar que não há dados na literatura que mostrem o efeito do CNF sobre a toxicidade celular em leucócitos humanos, sendo esta a primeira descrição.

Uma das formas de se avaliar a ativação celular de PBMCs é através do ensaio de proliferação celular, a qual é medida através da produção de formazan, ou seja, MTT no estado reduzido, que reflete a atividade de enzimas intracelulares (MOSMANN, 1983). Os resultados obtidos mostraram que os PBMCs incubados com 5µg/mL de concanavalina A proliferaram significativamente em relação ao controle. A estimulação de PBMCs por esse mitógeno envolve a ativação de uma complexa cascata de reações bioquímicas, promovendo a entrada das células no ciclo celular (DORN *et al.*, 2002). Porém, quando os PBMCs foram incubados com 50 µg/mL de CNF, não houve aumento da proliferação celular, indicando que o CNF não interfere na resposta proliferativa. Não há dados na literatura que mostrem o efeito do CNF ou de inibidores semelhantes ao CNF sobre a proliferação de PBMCs. Por outro lado, a literatura mostra que inibidores comerciais de FLA₂, tais como o araquidonil trifluorometilcetona e o bromoenol lactona, citosólica e independente de cálcio, inibem o efeito proliferativo de fibroblastos da linhagem 3T6 (SANCHEZ & MORENO, 2001) por inibir a atividade enzimática da enzima.

Dentre as citocinas produzidas por linfócitos T, que funcionam como fator de crescimento e diferenciação para estas células, está a IL-2 (KIDD, 2003). Assim, investigamos o efeito do CNF sobre a produção de IL-2 por PBMCs isolados. Os resultados obtidos mostraram que o CNF não interferiu na produção de IL-2, por estas células, no tempo estudado.

A literatura mostra que a IL-2 medeia a sobrevivência das células T e, isso parece ser dependente da ativação de um *pool* de proteínas quinases C (PKC) associadas à membrana que ocorre na ausência detectável de translocação da enzima do citosol para as membranas (LU et al., 1999). Uma vez que as FLA₂s induzem a ativação de PKC é possível que o CNF interfira na estimulação da PKC e desta forma não induza a produção de IL-2. Estudos voltados para esclarecer esse mecanismo serão conduzidos para melhor elucidar esse aspecto.

Sabendo que a IL-10 é uma citocina com propriedades imunomodulatórias sobre as funções monocíticas e macrofágicas, interferindo na capacidade destas células de apresentar antígenos, avaliou-se, neste estudo, o efeito do CNF sobre a produção de IL-10 por PBMCs. Os resultados obtidos mostraram que na concentração utilizada de CNF, o inibidor não exerceu efeito sobre a liberação de IL-10. O fato de o CNF não interferir na produção de IL-2 e IL-10 em PBMCs, nem tampouco haver interferência na proliferação pelo CNF, parece sugerir que o CNF não exerce efeitos sobre a funcionalidade de linfócitos. No entanto, é possível que esteja agindo preferencialmente sobre monócitos. Assim, um possível papel do CNF sobre células apresentadoras de antígenos não pode ser descartado, já que em monócitos e macrófagos, a IL-10 diminui a produção de mediadores inflamatórios e inibe a apresentação de antígenos. (SABAT *et al.*, 2010).

O TNF- α é um excelente mediador da resposta inflamatória, podendo ativar ou suprimir vários genes responsáveis pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias, de outros mediadores e de proteínas de fase aguda (PORTEU & NATHAN, 1990).

Nesse sentido, investigamos o efeito do CNF sobre a produção de TNF- α por PBMCs isolados. Os resultados obtidos mostraram que o CNF, em concentração não citotóxica de 50 μ g/mL, aumenta significativamente a produção de TNF- α por PBMCs. Não há dados na literatura que mostrem o efeito do CNF ou de inibidores semelhantes ao CNF sobre a produção de TNF- α . Entretanto, sabe-se que a crotapotina, o componente ácido da crotovina, é considerada o inibidor natural de FLA₂ e possui atividade anti-inflamatória *in vivo*. Ainda, em doses baixas, é capaz de inibir a produção de TNF- α em PBMCs (LANDUCCI, *et al.*, 1995). No entanto, no presente trabalho, quando o CNF foi utilizado, verificou-se que ele é

capaz de induzir a liberação de TNF- α . Ainda que o mecanismo pelo qual o CNF induz a produção de TNF- α em PBMCs não esteja esclarecido, é possível sugerir uma ação preferencial sobre monócitos, células importantes na apresentação de antígenos aos linfócitos T, e que são fonte dessa citocina (BLUMENSTEIN, 1997).

Ainda em relação à produção de TNF- α , estudos sobre a indução da expressão gênica dessa citocina pelo CNF estão em andamento em nosso laboratório. Dados preliminares indicam que o CNF induz a expressão gênica do TNF- α em PBMCs humanos (dados não mostrados). Além disso, estudos voltados para a fenotipagem celular são necessários para identificação do tipo celular responsável pela produção dessa citocina estimulado por CNF.

O alto consumo de O₂, associado à rápida ativação da NADPH oxidase, desencadeia o “burst” respiratório, com a subsequente produção de íons superóxido e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1984). Desse modo, avaliou-se a ação do CNF sobre a liberação de ânions superóxido por PBMCs. Os resultados mostraram que não houve aumento da produção de superóxido induzida por CNF em PBMCs. No entanto, a crotoxina foi capaz de induzir a produção de ânion superóxido, dado que está de acordo com SAMPAIO *et al.*, 2003, que demonstraram que o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* aumenta o “burst” respiratório, papel que foi atribuído à crotoxina. Com o intuito de verificar a capacidade de inibição do CNF sobre a crotoxina na produção de superóxido, realizou-se a incubação da crotoxina com o inibidor CNF. Os resultados obtidos mostraram que o CNF na concentração utilizada, quando incubado junto à crotoxina, foi capaz de reduzir significativamente a produção de ânion superóxido induzida por essa toxina. É possível que o CNF esteja competindo com o receptor alvo celular pela ligação à crotoxina, como proposto por FORTES-DIAS, *et al.*, 1994, o que impediu o efeito total na produção de superóxido induzida pela crotoxina.

Estudos para elucidar o mecanismo através do qual o CNF reduz o efeito da crotoxina na produção de superóxido em PBMCs ainda são necessários, no entanto, o dado apresentado é de notável importância, já que espécies reativas do oxigênio como o superóxido, quando em excesso são capazes de lesar o tecido envolvido. Dessa forma, a inibição da crotoxina pelo CNF, mostra-se como possível estratégia na resolução do envenenamento por serpentes, já que essa é a principal componente do veneno crotálico, representando 60% do veneno total (MOURA-GONÇALVES & VIEIRA, 1950). Além disso, o CNF torna-se uma alternativa não somente para o tratamento do envenenamento por serpentes, mas também como potencial em intervenções na atividade de FLA₂, associada a processos inflamatórios humanos.

Os neutrófilos, quando ativados exercem importantes funções de defesa no hospedeiro, como a produção e secreção de mediadores inflamatórios, bem como de agentes microbicidas e tumoricidas (CALDER *et al.*, 1995). Dessa forma, investigou-se a toxicidade do CNF sobre neutrófilos humanos. Os resultados iniciais obtidos não mostraram toxicidade do CNF *in vitro* em ensaio de MTT. Em relação a esse experimento, os resultados corroboram o papel do CNF como um possível fármaco, já que não possui toxicidade sobre PBMCs, bem como sobre neutrófilos.

Para destruição dos agentes fagocitados, os neutrófilos utilizam as vias oxidativa, com geração de espécies reativas do oxigênio e a não oxidativa, com ação das enzimas lisossomais, sendo a MPO a enzima chave na via oxidativa (CASSATELA, 1995). Nesse sentido, avaliou-se o efeito do CNF sobre a liberação de mieloperoxidase por neutrófilos. Os estudos mostraram que o CNF não alterou a produção de MPO quando comparado ao controle, enquanto que o LPS, utilizado como controle positivo, estimulou tal liberação. É possível sugerir que o CNF não induz funções microbicidas em neutrófilos, já que não estimula liberação de MPO, bem como não aumenta a geração de ânion superóxido. Até o momento, não há dados na literatura que mostrem o efeito do CNF ou de inibidores semelhantes ao CNF sobre a liberação de MPO e geração de EROs em neutrófilos.

Além de liberar MPO, adicionalmente, os neutrófilos, secretam citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-8, influenciando na resolução da inflamação (CASSATELA, 1995). Dessa forma, avaliou-se a influência do CNF na produção de IL-8 por neutrófilos humanos. Os resultados mostraram que o CNF na concentração utilizada, aumentou significativamente a produção de IL-8 por neutrófilos quando comparado ao controle. O fato de o CNF estimular a produção de IL-8, em neutrófilos, sugere que este inibidor estimule neutrófilos. É possível que o CNF exerça certa atividade no recrutamento de neutrófilos, já que induz, ainda que por um mecanismo não investigado, a produção de IL-8, que é uma citocina quimiotática (NIGGLI, 2003; KUMAR, *et al.*, 2005).

Tomados em conjunto, os dados obtidos permitem concluir que o CNF age sobre a função de PBMCs e neutrófilos humanos, pois induz a produção de TNF- α em PBMCs e de IL-8 em neutrófilos. Sabendo que a população de leucócitos totais do sangue periférico é composta por 60 a 70% de granulócitos e polimorfonucleares, 55 a 65% de linfócitos, 4 a 8% de monócitos e de 4 a 1% de eosinófilos e basófilos (BÖYUM, 1968) e que a população de PBMCs é composta de mononucleares e nesta, uma parte é representada por células apresentadoras de antígenos (monócitos, células dendríticas), é possível sugerir que o CNF

por não interferir na produção de IL-2 e IL-10, assim como na proliferação de PBMCs, esteja agindo preferencialmente sobre monócitos, apontando para uma participação dos monócitos como células apresentadoras de antígenos.

6 Conclusões

- Ü O CNF não apresenta citotoxicidade sobre PBMCs ou neutrófilos humanos nas concentrações utilizadas.
- Ü Na concentração de 50µg/mL o CNF não interfere na produção de IL-10 e IL-2, bem como na proliferação de PBMCs.
- Ü O CNF induz a liberação de TNF- em PBMCs humanos, por um mecanismo ainda não esclarecido.
- Ü O CNF, na concentração de 50µg/mL, não induziu produção de íons superóxido em PBMCs. Quando incubado junto à crotoxina, o CNF foi capaz de reduzir a produção desse agente estimulado pela crotoxina.
- Ü Em neutrófilos, o CNF induz a produção de IL-8, mas não induz a liberação de ânion superóxido e de MPO.

Em resumo, o CNF age sobre a funcionalidade de PBMCs, induzindo a produção de TNF- e de neutrófilos, pela indução da liberação de IL-8.

7 Referências Bibliográficas

- AMARAL, C. F., MAGALHAES, R. A., & DE REZENDE, N. A. Respiratory involvement secondary to crotalid ophidian bite (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 33: 251-255, 1991.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n.11, p.1163-68, 1987.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M; HERING, S.E.; CUPO, P. Acidente Crotálico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, JR. Acidentes Peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica de acidentes. São Paulo, Ed. **SARVIER**, p. 91-98, 2003.
- BABIOR, B.M. - The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, **73**: 599-1, 1984.
- BABIOR, B.M.; LAMBERTH, J.D.; NAUSSEF, W. The neutrophil NADPH-oxidase. **Arc. Biochem. Biophys**, 397, 2002.
- BANNER, D.W.; D'ARCY, A.; JANES, W.; GENTZ, R.; SCHOENFELD, H.J.; BROGER, C.; LOETSCHER, H.; LESSLAUER, W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. **Cell**, may. 7;73(3):431-45, 1993.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. **Arq Bras Med Hyg.**, 64: 14-20, 1990.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.; LAMBEZAT, M.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol**, 271-278, 1989.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.** 97:77-89, 1968.
- BLUMENSTEIN, M.; BOEKSTEGERS, P.; FRAUNBERGER, R. ANDREESSEN, ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; FINGERLE-ROWSON, G. Cytokine production precedes the expansion of CD14CD16 monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. **Shock** 8:73, 1997.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2º Edição. **Fundação Nacional de Saúde**, Brasília, 2001.
- BREITHAUP, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 292, n. 3, p. 271-278, mar, 1976b.

- CALDER, P. C. The effectes of dietary lipid manipulation upon the production of reactive oxygen species by murine peritoneal macrophages. **Biochem. Soc. Trans.**, v.23, n. 2, p. 280S, 1995.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WE, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica. **Sarvier** ed, São Paulo, 2009.
- CASSATELLA, M.A.; GASPERINI,S.; CALZETTI, F.; McDONALD, P.P.; TRINCHIERI, G. Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon- . **Biochem. J.** 310, 751-755, 1995.
- CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull World Health Organ.** 76(5):515-24, 1998.
- CLAMAN, H.N. The biology of immune response. **J Am Med Ass.** 258: 2834-2840, 1987.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 82, 924-929, 1988.
- CURA, J.E.; BLANZACO, D.P.; BRISSON, C.; CURA, M.A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J.C.; SILVEIRA, J.S.; THEILLER E.; DE ROODT, A.R.; VIDAL J.C. Phase I and phar-macokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA2, NSC-624244) in patients with advanced câncer, **Clin. Cancer Res**, 8: 1033–1041, 2002.
- De LEO, F.R.; QUINN, M.T. Assembly of the phagocyte NADPH-oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J. Leukoc. Biol.**, v.60, n.6, 1996.
- Dos SANTOS R.M.; OLIVEIRA L.C.; ESTEVÃO-COSTA M.I.; De LIMA, M.E.; SANTORO, M.M.; FORTES-DIAS, C.L. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). *Biochim Biophys Acta*. Nov 10;1717(1):27-33, 2005.
- DORN, A.D.; WATERS, W.R.; BYERS, V.M.; PESCH, B.A.; WANNEMUEHLER. M.J. Characterization of mitogen-stimulated porcine lymphocytes using a stable fluorescent dye (PKH2) and multicolor flow cytometry. **Vet Immunol Immunopathol.** Aug;87(1-2):1-10, 2002.
- FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). **Biochimie** v. 82, n. 9-10 p. 833-840, set. - out. 2000.
- FLYNN, J. L., GOLDSTEIN, M. M., CHAN, J., TRIEBOLD, K. J., PFEFFER, K., LOWENSTEIN, C. J., SCHEREIBER, R., MAK, T. W., BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. **Immunity**, June; 2(6):561-72, 1995.
- FORTES-DIAS, C. L., DINIZ, C. R, KOCHVA, E.,. Neutralization by homologous plasma of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and crotoxin. **Ciência e Cultura**. v. 42, n. 7, p. 501-506, 1990.

FORTES-DIAS, C. L., FONSECA, B. C., KOCHVA, E., DINIZ, C. R. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**. v. 29, n. 8, p. 997-1008, 1991.

FORTES-DIAS, C. L., LIN, Y., EWELL, J., DINIZ, C. R., LIU, T. Y. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 22, p. 15646-15651, jun. 1994.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A(2) in the blood plasma of snakes. **Toxicon**. v. 40, n. 5, p. 481-484, mai. 2002.

FRUCHT, D.M.; FUKAO, T. IFN- γ production by antigen –presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol.** 22:555-560, 2001.

FUCHS, J.; MUELLER, J.C.; LICHTNER, P.; SCHULTE, C.; MUNZ, M.; BERG, D.; ILLIG, T.; SHARMA, M.; GASSER, T. The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. **Elsevier**. 30(5):731-8, 2007

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets Inflamm Allergy**. 4: 281-286, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; WILLIAMS, D.; FAN, H.W.; WARRELL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach (Review). **Toxicon**. V. 56,7, 1223–1235, 2010.

HABERMANN, E., BREITHAUPT, H. The crotoxin complex - an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**. v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HENDON, R. A., FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 67, n. 7, p. 1560-1563, jul., 1971.

KAMMOUN, M., MILADI, S., BEN ALI, Y., DAMAK, M., GARGOURI, Y., BEZZINE, S. In vitro study of the PLA2 inhibition and antioxidant activities of Aloe vera leaf skin extracts. **Lipids in Health and Disease**. 10:30, 2011.

KERKIS, I.; SILVA, F.S.; PEREIRA, A.; KERKIS, A. RÁDIS-BAPTISTA, G. Biological versatility of crotamine – a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake, **Expert Opin. Investig. Drugs** 19: 1515–1525, 2010.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for the health and disease. **Alter Med Ver.** 8: 223-46, 2003.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukocytes Biology*, 77, 1109, 2005.

KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v. 72, n. 6, p. 595-607, Review, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins & Cotran – Patologia. São Paulo, **Ed. Elsevier**, 7 edição, p.49-89, 2005.

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. **J. Pathol.**, v. 190, n. 3, p. 343-348 Review, 2000.

LIZANO, S., DOMONT, G., PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-77, dez. 2003.

LU, Y.; MORLEY, P.; DURKINU, J.P. Signalling Events Mediating the Activation of Protein Kinase C by Interleukin-2 in Cytotoxic T Cells. **Cell. Signal.** Vol. 11, No. 4, pp. 275-285, 1999.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MADHAVI, N.; DAS, U.N.; PRABHA, P.S.; KUMAR, G.S.; KORATKAR, R.; SAGAR, P.S. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. Jul;51(1):33-40, 1994.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, JR. Acidentes Peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica de acidentes. São Paulo, Ed. **SARVIER**, p. 16-61, 2003.

MOURA-GONÇALVES, J.; VIEIRA, A. Estudo sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. Na. **Acad. Bras. Cienc**, v.22, p.141-150, 1950.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. Dec 16;65(1-2):55-63, 1983.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I; INOUE, K. Role of phospholipase A2 in mast cell activation and function. In: Phospholipase A2 in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology, v.5, p. 93-124, 1995.

NAHAS, L.; DENSON, K.W.E.;MACFARLANE, R.G. A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 12, n. p. 355-367, 1964.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. **Int. J. Biochem Cell Bioll**. v.35, n.12, 2003.

OHKURA, N., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **J. Biochem**. v. 113, n. 4, p. 413-419, abr. 1993.

OHKURA, N., OKUHARA, H., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochem. J.** v. 32 n. 2, p. 527-531, jul. 1997.

OKAMURA, H.; KASHIWAMURA, S.; TSUTSU, H.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI K. Regulation of interferon- production by IL-12 and IL-18. **Current opinion inn immunology**. 10: 259-284, 1998.

OKUMURA, K., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K. cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A(2) inhibitor PLIalpha from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*(1). **Biochim Biophys Acta**. v. 1441, 1-n. 1p. 51-60, out. 1999.

OKUMURA, K., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K. Identification of beta-type phospholipase A(2) inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 408, n.1, p. 124-130, dez. 2002.

OKUMURA, K., OHKURA, N., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of Agkistrodon blomhoffii siniticus. Sequence homologies with human leucine-rich alpha2-glycoprotein. **J Biol Chem**. v. 273, n. 31, p. 19469-19475, jul. 1998.

OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, A.N.; MENALDO, L.D.; BOLDRINI-FRANCA, J.; GIGLIO, J.R.; A. CALDERON, L.A.; STABELI, R.G.; RODRIGUES, F.H.S.; LJUBICA, T.; DA SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Structural and Functional Characterization of a -Type Phospholipase A2 Inhibitor from Bothrops jararacussu Snake Plasma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, 20, pp. 2509-2519(11), 2011.

PERALES, J., Villela, C., Domont, G. B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatche, H., Bon, C., Faure, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur J Biochem**. v. 227, p.19-26, 1995.

PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KUNDING, T.M., WAKEHAM, A., KISHIHARA, K., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., OHASHI, P.S., KRONKE, M., MAK, T.W. Mice deficiente for the 55 kd tumor necrosis factor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. **Cell**. may, 7.73(3):457-67, 1993.

PICOLO, G.;CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. **Life Sci**, v. 75, n. 5, p. 559-573, 2004.

POLIOUT, M.; GILBERT, C.; BORGEAT, P.; POUBLE, P. E.; BOURGOIN, S.; CREMION, C.; MACLOUF, J.; McCOLL, S. R.; NACCACHE, P. H. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p.1109-1123, 1998.

PORTEU, F.; NATHAN, C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. **J Exp Med**. Aug 1;172(2):599-607, 1990.

PRADO-FRANCESCHI, J.; TAVARES, D.Q.; HERTEL, E.A. Convulxin effect, a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. **Toxicon** 19, 661-665, 1981.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and Their Venoms**, v.2, p. 345-403 (Burchel, W. & Buckley, E. E. ed) New York: Academic Press, 1971.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am. J. Pathol.**, v. 86, n. 1, p. 183-276, Review, 1977.

SABAT, R.; GRUTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 21: 331–344, 2010.

Ramar, P. Perumal Samy^{1, 2,*}, Ponnampalam Gopalakrishnakone², Vincent TK Chow¹

SAMPAIO, S.C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; DOS SANTOS, E.C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxigenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 313-321, 2006a.

SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; DOS-SANTOS, E.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, 55: 1045–1060, 2010.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 671-676, 2005.

SÁNCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of phospholipases A(2) in growth-dependent changes in prostaglandin release from 3T6 fibroblasts. *J Cell Physiol.* Nov;189(2):237-43, 2001.

SCHRECK, R.; ALBERMANN, K.; BAEUERLE, P.A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Radic Res Commun.** 17(4):221-37, 1992

SCHINDLER H.M.; LUTZ, B. The production of INF- γ by IL-12/IL-18- activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **J Immunol.** 166: 3075-3082, 2001.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos e Notificação. **Ministério da Saúde.** www.saude.gov.br/sinanweb/. Dados de 2008.

SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT., H. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Memorias do Instituto Butantan**, pp. 505-512, 1938.

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.G., LRC; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators of Inflammation**, v. 5, n. p. 18-23, 1996.

SOUZA, K.; STEEGE, A.; BARON, S.L. Surveillance of occupational health disparities: Challenges and opportunities. **American Journal of Industrial Medicine**. 53:2; 84-94, 2010.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica et Biophysica Acta** 1760:1450-1457, 2006.

TARTAGLIA, L.A.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D.V. Ligand passing: the 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55 kDa TNF receptor. *Sep.* 5;268(25):18542-8, 1993.

THWIN, M. M., GOPALAKRISHNAKONE, P., KINI, R. M., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 96049611, ago., 2000.

VALENTIN, E; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity secreted phospholipases (A₂) and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, n.1-2, p.59-70, 2000.

VASSALI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.** 10:411-52, 1992.

VILLARRUBIA, V.G.; COSTA, L.A.; DÍEZ, R.A. Secreted phospholipases A2 (sPLA2): friends or foes? Are they actors in antibacterial and anti-HIV resistance? **Med.Clin. (Barc)**, 123: 749-757, 2004.

YU, W.; BOZZA, P.T.; TZIZIK, D.M.; GRAY, J.P. CASSARA, J.; DVORAK, A.M.; WELLER, PF. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **Am. J. Pathol.**, 152:759-69, 1998.

ZULIANI, J.P.; GUTIERREZ,J.M.; CASAIS E SILVA, L.L; SAMPAIO, S.C.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 Phospholipases A₂. **Toxicon**, 46: 523-32. 2005b.

8 Anexos

8.1 Soluções Utilizadas

Solução de Azul de Tripan (0,1%) 10X

Azul de Tripan 0,1 g (0,104mM)

Água destilada.....100 mL

Meio de cultura RPMI pH 7,2 (Solução Estoque)

RPMI-164010,4 g

Hepes 2,383 g (9,9 mM)

Água destilada1000 mL

Solução de RPMI pH 7,2 (Solução de Uso)

Meio RPMI.....90 mL

Soro Fetal Bovino.....10 mL

Gentamicina (100 µg/mL).....100 µL

L-glutamina.....1,0 mL

Solução de Glutamina (2mM) 100X

L-glutamina.....0,292 g (1,998mM)

PBS.....10 mL

Tampão Fosfato-salina (PBS, pH 7,2) 10X

NaH₂PO₄H₂O.....2,03 g (14,71mM)

Na₂HPO₄H₂O.....11,49 g (80,94mM)

NaCL..... 85g (1,454M)

Água destilada.....1000 mL

Solução de Tris HCL 50mM (pH 7.4)

Tris HCL.....3.94g

Água destilada.....500ml

Solução de lise de hemácias

Na₄Cl.....8,29g

KhCO₃.....3,0g

Na₂ EDTA.....0,0372g

Água destilada.....1000ml

pH 7.2

8.2 Drogas e reagentes

Acetato de forbol miristato - PMA (Sigma Chemical Company, EUA), Ácido acético glacial (Merck Germany), DMSO (Biotec, Brasil), Gentamicina (Hipolabor), (Newprov, Brasil), Germany), Hepes (Sigma Chemical Company, EUA), L-glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, EUA), Soro Fetal Bovino (Cultilab), O- fenilenodiamina –OPD (Sigma Chemical Company EUA), Hidróxido de potássio - KOH , Horseradish Peroxidase – HRP – (Pierce), Azul de nitrotetrazólio – NBT (Sigma Chemical Company EUA), Brometo Tiazolil azul de Tetrazólio – MTT (Sigma Chemical Company EUA), Ácido cítrico (Merck), Histopaque 1077 (Sigma Chemical Company EUA)

8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:

“Papel dos leucócitos na resposta inflamatória induzida por proteínas e peptídeos provenientes de secreções de anuros e de venenos de serpentes”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:

O motivo que nos leva a estudar a ação dos venenos de cobras e de secreções da pele de sapos e rãs sobre as células sanguíneas reside no fato de, além de se conhecer seus efeitos, procurar dentre essas ações possíveis efeitos farmacológicos que poderiam aprimorar a busca por novas moléculas para uso medicinal (farmacológico). A pesquisa se justifica, pois, o entendimento da inflamação que ocorre após a mordida da cobra e o contato com a pele do sapo/rã poderá nos dar a chance de estudar suas ações e procurar medicamentos que diminuam a inflamação e diminuam o tamanho da lesão. O objetivo desse projeto é o estudo da inflamação após a mordida da cobra e o contato com a pele do sapo/rã.

O(s) procedimento(s) de coleta de material e dados serão da seguinte forma: Quando o voluntário sadio aceitar a participar da pesquisa, este receberá o TCLE, e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletado 10mL de sangue periférico sob condições de assepsia e anti-sepsia de rotina hospitalar.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS:

Existe um desconforto mínimo, o de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue por punção justificada para que se possa realizar a determinação da inflamação.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O (s) pesquisador (es) irá (ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados das determinações da inflamação que serão realizadas dentro de laboratório de pesquisa serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O(a) professor(a) orientador(a) Juliana Pavan Zuliani certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar as estudantes Caroline, Sulamita e Adriana ou o(a) professor(a) orientador(a) Juliana Pavan Zuliani no telefone (69) 3219-6009 OU e-mail zuliani.juliana@gmail.com. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

<hr/>		
Nome	Assinatura do Participante ou Digital	Data
<hr/>		
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
<hr/>		
Nome	Assinatura da Testemunha	Data